

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Filip Jabůrek

Populace B-1 lymfocytů a jejich význam v rozvoji autoimunitních onemocnění

B-1 lymphocyte population and their role in the development of autoimmune diseases

Bakalářská práce

Školitelka: Mgr. Michaela Hájková

Praha, 2016

Poděkování

Rád bych poděkoval své školitelce Mgr. Michaelle Hájkové za odborné vedení, vstřícnost a nekonečnou trpělivost. Dále bych rád poděkoval své rodině za podporu v průběhu celého studia.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis:

Obsah

Abstrakt.....	6
1 Úvod.....	7
2 B-1 lymfocyty.....	8
2.1 Populace lidských B-1 lymfocytů.....	10
3 Mechanismy působení B-1 lymfocytů při rozvoji autoimunitních onemocnění.....	12
3.1 Proliferace B-1 lymfocytů a tvorba autoprotilátek.....	12
3.1.1 Koreceptor CD19	13
3.1.2 CD5 a SHP-1	13
3.1.3 Lektiny - CD22 a Siglec-G.....	14
3.1.4 Lyn	15
3.2 B-1 lymfocyty jako antigen prezentující buňky a stimulace T lymfocytů	15
3.3 Působení IL-10 a Toll-like receptorů	15
4 Autoimunitní onemocnění	17
4.1 Systémový lupus erythematosus.....	17
4.1.1 Izotypový přesmyk produkovaných protilátek	17
4.1.2 Inhibitor p18	19
4.1.3 BAFF, CD19 a jejich spojitost se SLE.....	19
4.2 B buněčná chronická lymfatická leukémie	20
4.2.1 Signalizace a reaktivita BCR	20
4.2.2 SPA-1.....	21
4.2.3 Enhancer E μ a onkogen TCL1.....	22
5 Závěr.....	23
6 Zdroje.....	24

Seznam zkratek:

Akt – jiný název pro protein kinázu B

BAFF – B-cell activating factor/faktor aktivující B buňky

Bcl-2 – B-cell lymphoma – 2/B buněčný lymfom - 2

BCR – B-cell receptor/buněčný receptor B buněk

BRD2 – bromodomain-containing protein 2/bromodoménu obsahující protein 2

CD – cluster of differentiation/diferenciační skupina

Cdkn2c – cyclin-dependent kinase inhibitor 2c/cyklin-dependentní kinázový inhibitor 2c

FcR – Fc receptor

IgM – immunoglobulin/imunoglobulin

IL– interleukin

ITIM – immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif/na tyrozinu založený inhibující motiv imunoreceptorů

LCK – lymphocyte-specific protein tyrosinkinase/specifická protein tyrozin-kináza lymfocytů

Lyn – Lck/Yes novel tyrosine kinase/tyrozin kináza

MAPK – mitogen-activated protein kinase/mitogenem aktivovaná protein kináza

MHC gp II – main histocompatibility complex glycoprotein II/hlavní histokompatibilní komplex glykoprotein II

PAMP - pathogen-associated molecular patterns/molekulární struktury typické pro patogenní buňky

Ras/ERK2 – rat sarcoma/extracellular signal regulated kinase/kryší sarkom/extracelulárním signálem regulovaná kináza

SHP-1 – Src-homolog phosphatase 1/ Src-homolog fosfatáza 1

SLE – systemic lupus erythematosus/systémový lupus erythematosus

SPA-1 – signal-induced proliferation-associated protein 1/signálem indukovaný s proliferací spojený protein 1

Syk – Spleen tyrosin kinase/tyrozin kináza vyskytující se ve slezině

TLR – Toll-like receptor

TNF – tumor necrosis factor/faktor nekrotizující nádory

TSLP – thymus stromatal lymphopoetin/stromální lymfopoetin z brzlíku

Abstrakt

B-1 lymfocyty jsou specifickým typem B buněk, jejichž vývoj probíhá především v neonatálním období života. Později je populace udržována prostřednictvím sebe obnovování. Od klasických folikulárních B lymfocytů se liší především tím, že k jejich vývoji dochází z jiného progenitoru, expresí některých povrchových znaků a produkcí polyreaktivních přirozených imunoglobulinů. Od objevení spojitosti mezi B-1 lymfocyty a rozvojem autoimunitních chorob došlo k vývoji pohledu na B-1 lymfocyty a k přehodnocování faktů o nich známých. Cílem této práce je podat přehled aktuálních znalostí o B-1 lymfocytech, mechanismů jejich působení při rozvoji autoimunitních chorob a nastínit možné využití těchto poznatků v terapeutické praxi.

Klíčová slova: B-1 lymfocyty, autoimunitní choroby, lupus, leukemie, SLE, B-CLL

Abstract

B-1 lymphocytes are specific type of B cells, development of which occurs primarily in neonatal period of life. Later, the population is maintained through self-renewal. B-1 lymphocytes differ from classic follicular B lymphocytes in development from a distinct progenitor, expression of specific surface markers and production of polyreactive natural immunoglobulins. Since the discovery linking B-1 lymphocytes to the development of autoimmune diseases there was a shift in perspective on the B-1 lymphocytes and revaluation of the known facts. The aim of this thesis is to present a summary of current knowledge about B-1 lymphocytes, mechanisms of their effect on the development of autoimmune diseases and to outline the possible application of these findings in therapeutic practice.

Key words: B-1 lymphocytes, autoimmune diseases, lupus, leukemia, SLE, B-CLL

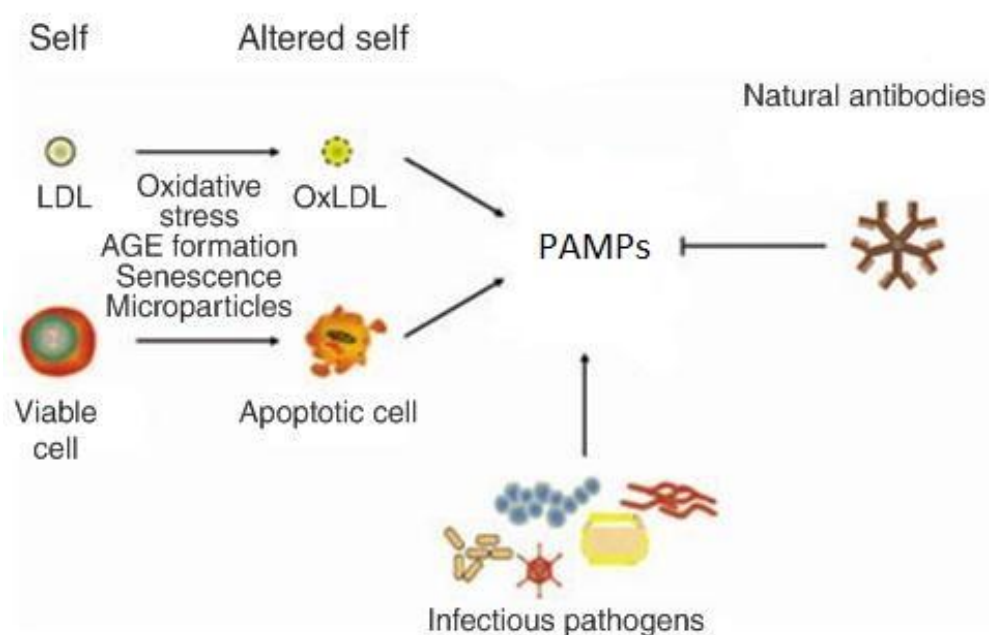
1 Úvod

Od objevu B-1 lymfocytů v myších jedincích uběhlo více než 30 let (Hayakawa et al. 1983). Během následující doby bylo učiněno několik dalších velmi významných objevů, které ukázaly na existenci více typů B-1 lymfocytů a zpřesnily pohled na jejich vlastnosti a fenotyp. Původně nebyla populaci B-1 lymfocytů přikládána žádná větší důležitost, ale po spojení jejich vlivu a vzniku autoimunitních onemocnění se opět staly žádaným tématem. Další výzkumy přinesly nové poznatky, které se ovšem zdály být neužitečné, protože se nepodařilo objevit populaci shodných buněk u člověka. To se změnilo s příchodem roku 2008, kdy se začaly objevovat první informace o možné existenci B-1 lymfocytů u lidí.

Tato práce se věnuje B-1 lymfocytům a jejich spojitosti se vznikem a rozvojem autoimunitních chorob se zvláštním důrazem na systémový lupus a B buněčnou leukemii, jako častých autoimunitních chorob. První kapitola se věnuje uvedení B-1 lymfocytů a ustanovení jejich terminologie spolu s pohledem na vývoj a specifické znaky. Druhá kapitola popisuje mechanismy, kterými se B-1 lymfocyty podílejí na rozvoji autoimunitních chorob. Závěrečná kapitola se věnuje dvěma autoimunitním chorobám - systémovému lupusu a B buněčné leukemii a spojitosti jejich rozvoje s B-1 lymfocyty, včetně uplatňujících se mechanismů a možných terapeutických využití těchto poznatků.

2 B-1 lymfocyty

B-1 lymfocyty jsou zvláštní skupinou B buněk. Za běžných podmínek, se populace B-1 lymfocytů podílí na udržování homeostázy, ochraně proti bakteriálním infekcím, virovým nákazám a v některých případech dokonce na obraně proti parazitům (viz. obr.1). K přeměně správně fungujících lymfocytů na autoreaktivní dochází vlivem změn v regulaci jejich vývoje a funkce.

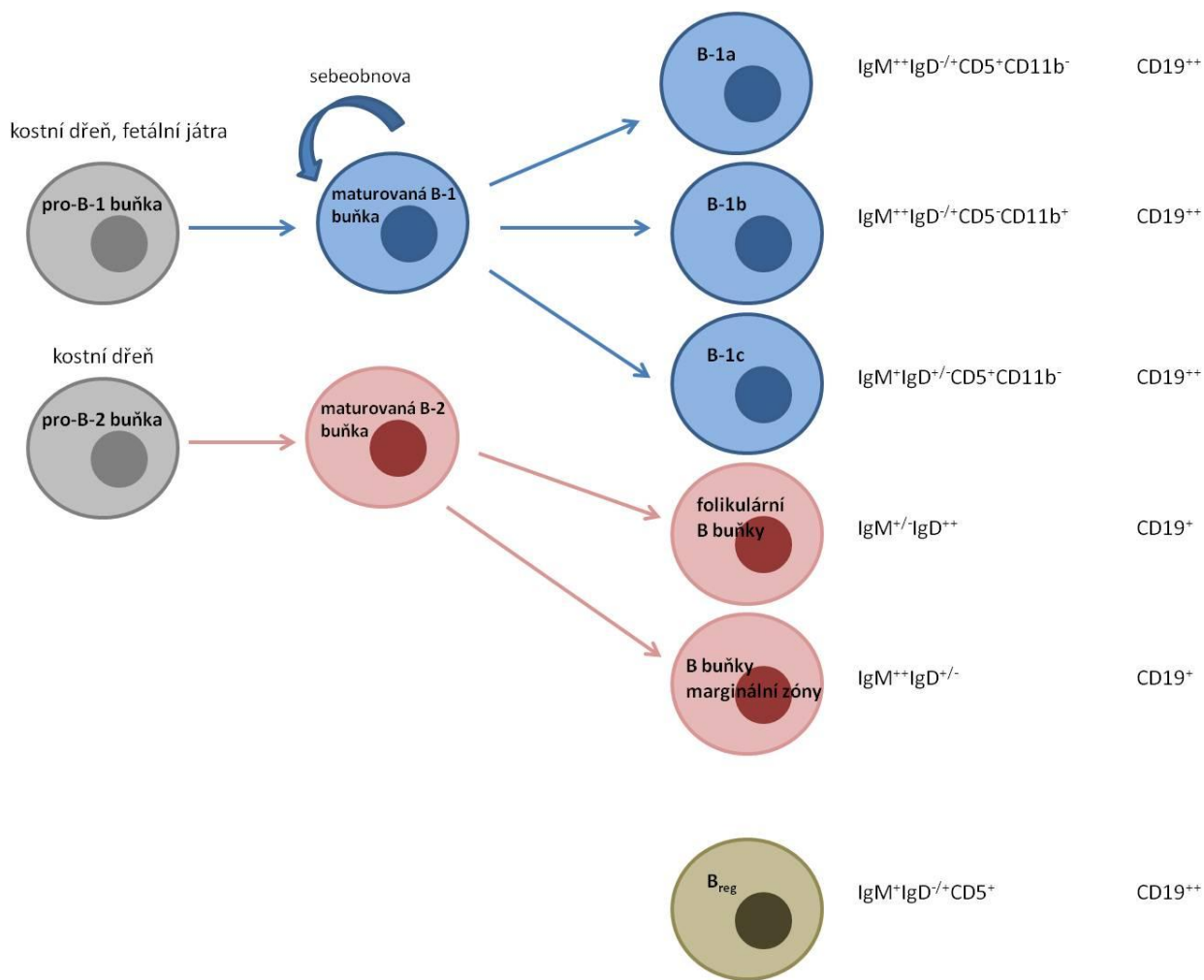


Obrázek 1 - regulace homeostázy pomocí B-1 lymfocytů, B-1 lymfocyty chrání organismus před oxidativním stresem, apoptotickými buňkami a patogeny, které rozpoznávají pomocí PAMP (patogen-associated molecular patterns/molekulární struktury typické pro patogenní buňky) a tvoří proti nim protilátky, LDL (low density lipoprotein/nízkodenzitní lipoprotein) OxLDL (oxidized low-density lipoprotein/nízkodenzitní oxidovaný lipoprotein) upraveno podle (Schwartz-Albiez et al. 2009).

Od klasických folikulárních lymfocytů (B-2 lymfocyty) se liší především fenotypově a dále funkcí a distribucí v organismu. Pro B-1 lymfocyty je typický fenotyp IgM^{high} IgD^{low} CD5⁺, zatímco pro folikulární lymfocyty je typický fenotyp IgM^{low} IgD^{high} CD5⁻ (viz obr.2) (Hardy & Hayakawa 1991). K vývoji B-1 lymfocytů dochází během fetálního a neonatálního vývoje člověka a jejich pozdější udržování probíhá především díky efektu sebeobnovování. Absence efektivní produkce

B-1 lymfocytů v kostní dřeni dospělých jedinců vedla k předpokladu, že k jejich vývoji dochází z odlišného prekursoru citlivého na thymální stromální lymphopoietin (TSLP) a interleukin 7 (IL-7). Tyto předpoklady se ukázaly jako správné, když v roce 2006 Montecino-Rodriguez et. al. objevili progenitor s danými vlastnostmi, který dával vzniknout právě jen B-1 lymfocytům (Montecino-Rodriguez et al. 2006). Během vývoje B-1 lymfocytů se uplatňuje celá řada faktorů, mezi které patří jak receptory společné pro celou populaci B buněk, tak i takové, které jsou specifické pro B-1 lymfocyty. Mezi tyto faktory patří B220 (izotyp běžného leukocytárního antigenu CD45) (Rodig et al. 2005) a CD19+ (specifický antigen B lymfocytů), specifický antigenní receptor B buněk (BCR, B-cell receptor) nebo přestavba a následná exprese těžkých řetězců imunoglobulinů (Montecino-Rodriguez et al. 2006).

Kritickým faktorem, jehož působení se uplatňuje během maturace a proliferace B-1 buněk, je také faktor aktivující B buňky (BAFF, B cell activating factor). BAFF, který patří do rodiny TNF (tumor necrosis factor), musí být při vývoji buněk přítomen ve správné koncentraci. V případě nízké hladiny ztrácí buňky schopnost dozrávat a umírají, naopak při zvýšené hladině dochází ke vzniku autoreaktivních lymfocytů (Fairfax et al. 2015). Dalším znakem B-1 lymfocytů je nízká exprese membránového proteinu Syndecan-1 a hlavního histokompatibilního komplexu I-A (MHC II, main histocompatibility komplex) (Tung et al. 2006). Během vývoje B-1 lymfocytů dochází k jejich rozlišení na dvě samostatné skupiny. Rozdělení do těchto skupin je založeno na základě povrchových molekul. V případě B-1a lymfocytů se na povrchu buněk vyskytuje CD5+. Druhou skupinou jsou B-1b lymfocyty, které mají podobný fenotyp jako B-1a buňky, nicméně u nich nedochází k expresi CD5, a naopak dochází k expresi CD11b. V roce 2006 přišli Hastings et. al. s objevem nové, dosud neznámé populace B lymfocytů, jejíž fenotyp je CD11b- CD5+. Tyto nově objevené buňky vykazovaly specifika B-1 lymfocytů, jako je spontánní sekrece IgM atd., jejich fenotyp ovšem neodpovídal žádným dosud známým B-1 lymfocytům. Díky těmto poznatkům byly tyto buňky ustanoveny jako nový typ B-1 lymfocytů, konkrétně B-1c. Jejich populace je však značně malá a další výzkum tímto směrem nebyl zatím proveden (Hastings et al. 2006). Kromě dříve zmíněných znaků se populace B-1a a B-1b lymfocytů liší i v dalších aspektech. Jedním z nich je i jejich funkce. B-1a buňky produkují přirozené protilátky, které rozpoznávají antigeny o vysoké molekulární hmotnosti. Tyto protilátky se podílí především na prvotní imunitní odpovědi. Naproti tomu B-1b lymfocyty produkují protilátky, jejichž funkcí je dlouhodobá ochrana. Tyto protilátky navíc přichází na řadu až jako cílená odpověď na podnět. (Alvares-Saraiva et al. 2015).



Obrázek 2 – vývoj B lymfocytů se zaměřením na B-1 lymfocyty, vývoj B-1 lymfocytů probíhá ze specifického progenitoru a jejich populace je udržována prostřednictvím sebeobnovování, existují 3 subpopulace B-1 lymfocytů lišící se specifickými znaky jako je přítomnost CD11b, CD5 nebo množství syntetizovaných imunoglobulinů. Regulační B buňky (B_{reg}) mají znaky B-1 i B-2 buněk a jejich přesný vztah s těmito dvěma populacemi zatím není spolehlivě objasněn.

2.1 Populace lidských B-1 lymfocytů

Výše zmíněné charakteristiky B-1 lymfocytů platí pro buňky vyskytující se v organismu myších jedinců, kde došlo k jejich objevení. Od té doby byla vyvíjena snaha nalézt buňky s podobným fenotypem i u člověka. První výsledky ukazující na existenci lidských B-1 lymfocytů nebyly dostatečně přesvědčivé, především z důvodu jejich neuspokojivého odlišení od ostatních typů B a T lymfocytů (*Boumsell et al. 1978*). Právě nedostatečné odlišení od ostatních populací se projevovalo vysokým podílem zastoupení domnělých B-1 lymfocytů ve vzorcích. Díky výsledkům těchto studií vyšlo najevo, že CD5 je z hlediska identifikace buněk v lidském organismu

nevyhovující, z důvodu jeho exprese na větším počtu populací (*Sims et al. 2005*). To vedlo k pochybnostem, zda se vůbec u člověka tato populace nachází. Griffin et al. přišli s novým postupem odlišení B-1 buněk, který byl založen na analýze vlastností B-1 lymfocytů, jako je kupříkladu spontánní sekrece IgM. Tento přístup odhalil kombinaci CD27 a CD43 jako klíčovou pro nalezení lidských B-1 lymfocytů, v populaci CD20 a CD19 pozitivních buněk, která byla stanovena, aby se předešlo znehodnocení výsledků z důvodu započítání plasmablastů, které jsou CD20 negativní. Ze stejného důvodu byly vyřazeny buňky nesoucí CD69 a CD70, které se vyskytují na naivních nebo paměťových B buňkách po jejich stimulaci. Jako klíčová charakteristika lidské populace B-1 lymfocytů byla tedy stanovena kombinace CD20⁺CD27⁺CD43⁺ (viz obr.3). Počet takovýchto buněk se v organismu pohybuje okolo 1,2-9% v závislosti na věku a vyznačuje se stejnými vlastnostmi jako myší B-1 lymfocyty (samovolná sekrece protilátek, tvorba anti-fosfocholinových protilátek a produkce autoproti látek). (*Griffin et al. 2011*). Zmiňovaný postup pro identifikaci lidských B-1 lymfocytů byl již potvrzen jako správný a v klinické praxi poměrně snadno aplikovatelný (*Suchanek et al. 2012*).



Obrázek 3 - rozdíly mezi populacemi myších a lidských B-1 lymfocytů, typický B-1 lymfocyt myší a lidské populace s charakteristickými znaky (tučně vyznačené znaky jsou klíčové pro identifikaci B-1 lymfocytů od ostatních leukocytů). Přestože lidská populace B-1 lymfocytů není naprosto totožná s myší, jejich funkce se jeví jako shodná.

3 Mechanismy působení B-1 lymfocytů při rozvoji autoimunitních onemocnění

V posledních desetiletích došlo s rozvojem výzkumu autoimunitních onemocnění k objevům, které poukázaly na možné propojení jejich vzniku s populací B-1 lymfocytů. Jedny z prvních zmínek v této souvislosti se objevily ve studii věnující se upstream regulaci B-2 lymfocytů. Výsledkem této studie bylo zjištění, že omezení exprese klíčových regulačních faktorů vývoje B lymfocytů, má za následek snížení populace B-2 lymfocytů. Navzdory tomu byly detekovány zvýšené počty B buněk v peritoneálních dutinách a v periferním oběhovém systému. Tyto buňky neexprimovaly CD5 (povrchový znak B-1a, c a T lymfocytů), zároveň však docházelo k expresi CD11b, čímž se odlišovaly od dosud známých B buněk. Tyto poznatky vedly autory studie k domněnce o existenci nového buněčného typu a zároveň o jeho možném propojení s autoimunitními chorobami (*Lanier et al. 1981; Hayakawa et al. 1983*). Během následujících let byly poznatky o B-1 lymfocytech dále rozšiřovány a zpřesňovány. Dnes je známo, že jejich podíl na vzniku autoimunitních chorob je nezanedbatelný. S postupující úrovní znalostí se navíc ukázalo, že působení B-1 lymfocytů je daleko komplikovanější, než se původně přepokládalo a také, že existuje několik mechanismů, kterými může být rozvoj autoimunitní choroby iniciován.

3.1 Proliferace B-1 lymfocytů a tvorba autoprotilátek

Za běžných situací hrají B-1 lymfocyty důležitou roli v udržování homeostázy. Jejich autoreaktivní protilátky například umožňují tělu zbavovat se apoptotických buněk. Funkce B-1 lymfocytů je proto regulována velkým množstvím receptorů a regulačních kroků. (viz. obr.4). V případě změny v této regulaci může dojít k patologickým změnám na populaci B-1 lymfocytů, které vedou k rozvoji závažných onemocnění. Jak již bylo zmíněno, BCR hrají důležitou roli během vývoje B-1 buněk. Nesprávná funkce BCR se může projevit mnoha způsoby. Mezi to patří především apoptóza, snížená citlivost, případně může dojít ke stimulaci odpovědi na antigeny. V závislosti na kvalitě signálu přijatého BCR může dojít ke dvěma extrémním situacím. Pokud je signál příliš silný, popřípadě dlouhý, může na jeho základě dojít ke vzniku autoimunitní reakce. V opačném případě, kdy má signál nevyhovující kvalitu, dochází k nedostatečné funkci imunitního

systému. Z toho důvodu existuje v organismu celá řada koreceptorů, které se podílejí na regulaci signalizace BCR, tento postup má za úkol udržet správnou odpověď BCR na signál. Mnoho mutací, které souvisí s těmito receptory, se proto později projeví na funkci daných buněk. Celý proces má negativní i pozitivní regulaci. Pozitivně regulující je CD19. Negativními regulátory jsou CD22, Siglec-G, CD5, Lyn, SHP-1. Vzhledem ke složitosti a komplexnosti imunitního systému jsou i pochody regulující BCR vysoce provázané a často nemůže jeden bez druhého fungovat.

3.1.1 Koreceptor CD19

Jedním ze známých pozitivních regulátorů BCR signalizace je CD19. Kromě pozitivní funkce, však může být CD19 v některých případech zodpovědný za přeměnu fyziologických B-1 lymfocytů v patogenní buňky, protože bylo dokázáno, že pro autoimunitní projevy způsobené B-1 lymfocyty je bezpodmínečně nutné, aby byla přítomna určitá hladina exprese CD19 (*Fairfax et al. 2015*).

3.1.2 CD5 a SHP-1

Jedním z nejdůležitějších koreceptorů, který je na povrchu B-1 lymfocytů exprimován, je CD5. Původně byl CD5 objeven na T lymfocytech, pro které je typický, později došlo k jeho objevu i na populaci B-1a a c lymfocytů. Jako hlavní koreceptor ovlivňuje CD5 ostatní koreceptory, které by v některých případech bez jeho funkce nedokázaly plnit svou úlohu. Zároveň se předpokládá, že CD5 inhibuje schopnost proliferace a autoreaktivity B-1 lymfocytů prostřednictvím negativního působení na BCR, konkrétně na signalizaci zprostředkovanou IgM (*Bikah et al. 1996*). Během tlumivého působení CD5 na BCR dochází k inhibici jeho vápníkem zprostředkované odpovědi, k přesunu kinázy Akt a k aktivaci Ras/ERK2 dráhy. Zajímavým efektem, je produkce IL-2, která je za normální situace typická pro T lymfocyty. U B-1 lymfocytů je umožněna právě přítomností CD5 v kombinaci s BCR (*Gary-Gouy et al. 2002*). Jelikož jsou B-1b buňky (které nemají CD5) méně citlivé na signalizaci zprostředkovanou vápníkem, je třeba aby BCR spolupracoval s CD19 a došlo ke znásobení síly signálu. V případě absence CD19 dochází k zastavení vápenaté signalizace a to zejména na úrovni mobilizace extracelulárního vápníku (*Dasu et al. 2009*).

Další z regulačních molekul, které se podílí na regulaci BCR, je tyrosin fosfatáza SHP-1. Působení SHP-1 je v populaci B-1 buněk úzce spjato s již zmiňovaným CD5, což je odlišnost od B-2 buněk, kde tomu tak není. Během této signalizace dochází k fosforylaci ITIM motivů (immunoreceptor thyrosin-based inhibition motif) na CD5, na které se následně naváže SHP-1 (*Sen et al. 1999*). Katalytická aktivita spárovaného CD5 a SHP-1 potom umožňuje regulaci BCR. V případě, že dojde k mutaci, která způsobí nefunkčnost SHP-1, dochází ke zmnožení populace B-1a buněk, které se projevuje na úkor B-2 lymfocytů, dalšími změnami jsou obnova vápníkem zprostředkované odpovědi a autoimunitní projevy (*Pao et al. 2007*).

3.1.3 Lektiny - CD22 a Siglec-G

Negativní regulátory BCR signalizace CD22 a Siglec-G spadají shodně do skupiny Ig-like lektinů vážících sialové kyseliny (*Crocker et al. 2007*). V případě zvýšené exprese Siglec-G, jehož výskyt je specifický právě pro podtyp B-1 buněk, dochází k inhibici Ca^{2+} signalizace. U Siglec-G defektních myší dochází k markantnímu nárůstu velikosti populace B-1 buněk, jejich imunitní odpověď ale bývá v normě, jedinou změnou je nárůst hodnot IgM, které mohou být 5-7x vyšší (*Ding et al. 2007; Hoffmann et al. 2007*). CD22 funguje jako modulátor signalizace zprostředkované pomocí BCR. V případě nefunkčnosti CD22 dochází k normálnímu vývoji B-1 lymfocytů, ale po aktivaci jejich BCR dojde v nepřítomnosti CD22 k masivnímu vtoku vápenatých iontů a vyvolání apoptózy (*Nitschke et al. 1997*). Zároveň s vtokem vápníkových iontů dochází k tvorbě autoprotilátek IgG s vysokou afinitou, čímž se výrazně zvyšuje pravděpodobnost vzniku autoimunitních chorob (*O'Keefe et al. 1999*).

Jellusová et. al., provedli test na modelové myši, jejíž receptory CD22 i Siglec-G byly deaktivovány. Pokus sloužil jako demonstrace vlivu zvýšeného počtu B-1 buněk na rozvoj autoimunitních onemocnění. Modelové myši vykazovaly mnohonásobně zvýšené počty B-1 lymfocytů a to dokonce i oproti Siglec-G defektním jedincům. Současně s tím se projevila u těchto B-1 lymfocytů snížená citlivost, hyperproliferace indukovaná pomocí ligandů TLR (Toll-like receptor) a nekontrolovaná tvorba IgG autoprotilátek, u starších jedinců navíc dochází k rozvoji zánětlivého onemocnění glomerulů – glomerulonefritidě (*Jellusova et al. 2010*).

3.1.4 Lyn

Lyn, kináza z rodiny Src, je nepostradatelnou součástí kontrolních mechanismů B-1 buněk. Během výzkumu došlo ke zjištění, že Lyn je u B-1 buněk aktivována od samotného počátku. Zároveň má Lyn dvojí účinek, v malých koncentracích je pro B-1 buňky nepostradatelná a zajišťuje aktivaci BCR signalizace. Naopak v příliš vysokých dávkách působí negativně především na signalizaci zprostředkovanou vápníkem a proliferaci. Kromě již zmiňovaných funkcí negativně reguluje BCR signalizaci prostřednictvím fosforylace ITIM koreceptorů BCR (*Dasu et al. 2009; DeFranco et al. 1998*).

3.2 B-1 lymfocyty jako antigen prezentující buňky a stimulace T lymfocytů

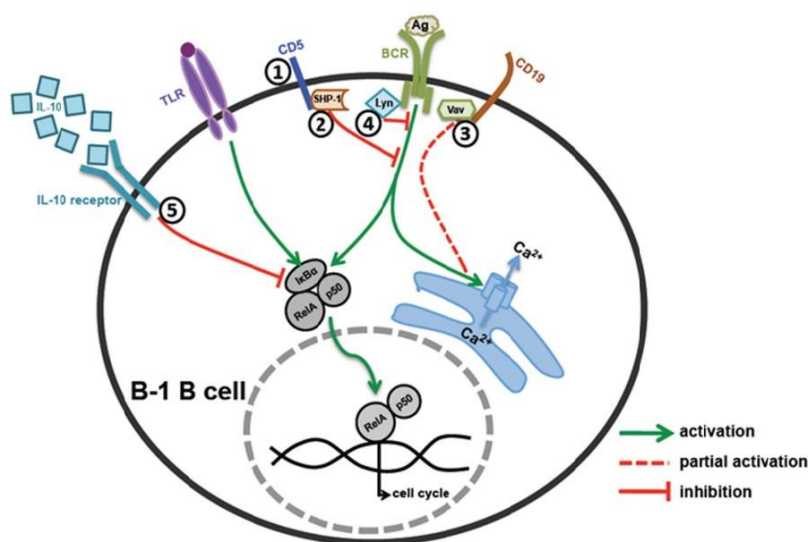
Kromě výše zmíněných autoprotilátek se B-1 lymfocyty podílejí na vzniku a rozvoji autoimunitních chorob dalším mechanismem. Konkrétně se jedná o ovlivnění T lymfocytů. Na tomto fenoménu se podílejí výhradně B-1 lymfocyty na kterých je exprimováno CD11b. Jedná se tedy o B-1b lymfocyty. Tyto buňky mají zvýšenou schopnost stimulovat T lymfocyty. Griffin a Rothstein et al. ukázali, že je možné spojit působení B-1b lymfocytů na proliferaci T lymfocytů s expresí CD86, která byla na CD11b⁺ buňkách zjištěna v mnohem větší míře. Jelikož se zároveň B buňky podílí na prezentaci antigenů, mohou hrát změny na B-1 buňkách podstatnou roli v abnormálních funkcích T lymfocytů během autoimunitních chorob. Za normální situace by tyto změny nehrály podstatnou roli z důvodu velmi nízkého počtu B-1b buněk v organismu. Během autoimunitních chorob, ale dochází ke zvětšení této populace, která může být později až čtyřnásobná. Obě zmíněná zvýšení mají za následek mnohem výraznější ovlivnění T lymfocytů (*Griffin & Rothstein 2011*).

3.3 Působení IL-10 a Toll-like receptorů

Relativně nedávno bylo potvrzeno, že B-1 lymfocyty jsou schopné spontánně sekretovat IL-10, ten působí jako regulátor prezentace antigenů, regulátor proliferace T lymfocytů a jako protizánětlivý faktor (*Griffin & Rothstein 2012*). Při vysoké hladině je IL-10 navíc schopen v B-1

lymfocytech potlačit odpověď na ligandy TLR inhibicí dráhy NF- κ B, což by mohlo mít efekt na prevenci aktivace a vzniku autoreaktivních jedinců pod vlivem TLR signalizace. Zároveň má IL-10 v případě B-1 lymfocytů schopnost seberegulace, prostřednictvím inhibice proliferace. Podle stejné studie dochází v největší míře k produkci IL-10 na B-1a lymfocytech, navíc je produkce IL-10 znásobena pod vlivem TLR. Působením ligandů TLR v různých koncentracích lze docílit také produkce dalších interleukinů, jako je IL-6 nebo IL-12p40. Kromě toho je možno působením ligandů TLR docílit také sekrece všech typů imunoglobulinů s výjimkou IgA (*Sindhava et al. 2010*).

U B-1 lymfocytů dochází k syntéze více typů TLR (TLR1,2,3,4,5,7,9). Všechny působí jako receptory schopné rozpoznat molekulární vzory patogenů. B-1 lymfocyty mohou být působením ligandů TLR aktivovány k masivní proliferaci a také k tvorbě protilátek. Pokud k této aktivaci dojde u B-1 lymfocytů s autoreaktivními BCR, může celý proces aktivace vést k tvorbě autoreaktivních B lymfocytů. TLR jsou také schopné tvořit vazbu s BCR, ta má za následek seberegulaci prostřednictvím zvýšení exprese TLR9 a odpovědi na jeho ligandy (*Gururajan et al. 2007*). Kromě samotné aktivace syntézy protilátek, jsou TLR schopné tuto produkci mnohonásobně zvýšit. Výrazné zvýšení následuje především po vystavení buněk vlivu TLR4 a TLR9. Přesný mechanismus ovšem zatím není znám. B-1 lymfocyty jsou pod vlivem TLR schopné přecházet v plasmatické buňky mnohem snadněji než je tomu u B-2 lymfocytů (*Kubo et al. 2009*).



Obrázek 4 - regulace aktivace B-1 lymfocytů, (1, 2) CD5 v blízkosti BCR slouží jako vazebné místo pro SHP-1, což umožňuje regulaci BCR, (3) CD19 regulující vápníkovou odpověď, (4) regulace zprostředkovaná pomocí kinázy Lyn ovlivňující pomocí fosforylace CD5 receptor BCR, (5) navázání IL-10 na receptor vede k inhibici signální kaskády spuštěné aktivací BCR a TLR (*Sindhava & Bondada 2012*)

4 Autoimunitní onemocnění

K výzkumu autoimunitních onemocnění je třeba používat organismy, které mají uměle navozeny modelové autoimunitní choroby. Příkladem takového onemocnění je systémový lupus erythematosus (SLE, systemic lupus erythematosus), případně B buněčná lymfatická leukemie (B-CLL, B-cell chronic lymphocytic leukemia). Obě tyto nemoci jsou relativně hojně rozšířenými autoimunitními onemocněními, která se navíc dají dobře indukovat u modelových organismů. Z těchto důvodů jsou ideální pro výzkum. V posledních desetiletích došlo během výzkumu autoimunitních onemocnění k rozvoji, který poukázal na možnost spřažení jejich vzniku s populací B-1 buněk.

4.1 Systémový lupus erythematosus

SLE je autoimunitním onemocněním, které postihuje především mladé ženy. Jedním z problémů je široká škála nepříliš specifických projevů, která ztěžuje diagnostiku. Mezi nejčastější společné projevy, ale patří produkce autoprotilátek reagujících na antigeny buněčného jádra. Tento fakt vede k tvorbě a ukládání imunokomplexů ve tkáních, což vede k chronickému zánětu, který má za následek poškození ledvin, centrální nervové soustavy a dalších orgánů. Uvedené změny jsou mimo jiné způsobeny změnou v populaci B-1 buněk, které přichází o schopnost tolerance antigenů těla vlastních.

4.1.1 Izotypový přesmyk produkováných protilátek

B-1 lymfocyty produkují protilátky, které jsou specificky pozměněny a také dochází ke snížení aktivačního prahu, což těmto buňkám umožňuje spontánní sekreci autoprotilátek (*Hayakawa et al. 1983*). Pro B-1 buňky je za běžných podmínek typický izotyp IgM, ovšem během onemocnění SLE se u nemocných nalézá zvýšené množství izotypu IgG. Poznatky dokazující výskyt IgG u pacientů se SLE byly známy již z dřívějších prací, nebyli ale důkazy o propojení s B-1 lymfocyty (*Baumgarth et al. 2005*). Enghard et. al. přinesli důkazy o změně sekretovaného izotypu imunoglobulinu během onemocnění SLE. Výzkum byl prováděn na myších jedincích NBZ/W F1, kteří mají indukovan SLE. S narůstající dobou rozvoje onemocnění vyšlo najevo, že dochází ke zmnožení počtu B-1a lymfocytů nalézajících se v peritoneálních dutinách a slezině. Tyto přírůstky

nebyly zanedbatelné, zatímco u mladých myší ve věku 6 týdnů byl počet buněk v peritoneálních dutinách kolem $1,5 \cdot 10^6$, u myší ve věku 6 měsíců dosahovalo toto číslo již hodnoty $5,4 \cdot 10^6$. U nejvíce postižených myší, u kterých se začala projevovat nefritida, byly dokonce nalezeny B-1a lymfocyty také v brzlíku a v ledvinách. Ve většině případů buněk nalezených v peritoneálních dutinách docházelo k syntéze IgM protilátek, ovšem některé buňky tuto schopnost ztratily. Buňky izolované ze sleziny vykazovaly větší míru posunu tvořeného izotypu. Toto číslo rostlo s věkem modelového organismu. Konečné hodnoty ukazují až 72% buněk, které ztratily schopnost sekretovat IgM. Buňky nalezené v brzlíku a ledvinách vykazovaly ještě nižší hodnoty IgM pozitivních buněk. S postupem onemocnění se číslo buněk, které ztratily schopnost syntetizovat IgM, dále zvyšovalo ve všech oblastech, ze kterých byly buňky izolovány. Bylo ovšem potřeba určit, zdali je tento úkaz specifický pro nemocné jedince. Z toho důvodu byly porovnány nemocné samice, které dle Theofilopoulos et. al. vykazují mnohem rozvinutější formu onemocnění se zdravými rodiči a samčími sourozenci, kteří měli projevy onemocnění mírnější (Theofilopoulos & Dixon 1985). Tímto testem se došlo ke zjištění, že nemocní jedinci mají mnohem vyšší počet buněk, u kterých došlo ke změně produkovaného izotypu Ig. Současně se ukázalo, že jedinci s rozvinutější formou onemocnění, tedy samice, mají vyšší počet buněk, které prodělaly změnu produkovaného imunoglobulinu, než jedinci s méně rozvitou formou, tedy samci. Zároveň došlo ke zjištění, že počet buněk, které ztratily schopnost tvorby IgM se liší v závislosti na místě jejich výskytu. Nejvyšší měrou byly postiženy buňky vyskytující se v ledvinách (asi 41%), kdežto u buněk nacházejících se v peritoneálních dutinách došlo ke změně jen v 3,4% případů. Aby se dalo dokázat, že u B-1a buněk skutečně dochází ke změně produkce izotypů imunoglobulinů, bylo třeba provést další testy. Proto byly z mladých jedinců izolovány B-1a buňky produkující IgM. Tyto buňky byly označeny a přeneseny do starších jedinců, u kterých byl již SLE v pokročilých stádiích. Po 5 a 8 dnech byly buňky izolovány a podrobeny testům, které prokázaly, že dochází ke změně produkovaných imunoglobulinů, přičemž nejvíce transformovaných buněk bylo nalezeno ve slezině a postižených orgánech. S narůstající dobou, kterou tyto buňky strávily v nemocných jedincích, se procento transformovaných buněk zvyšovalo a docházelo k jejich změnám i na dalších místech organismu. Během tohoto výzkumu také vyšlo najevo, že s postupem onemocnění dochází ke snižování počtu autoreaktivních buněk v peritoneálních dutinách navzdory celkově se zvyšujícímu počtu B-1a lymfocytů. To je způsobeno jejich přesunem do sleziny a orgánů postižených zánětem, kde se jejich počty naopak zvyšují (Enghard et al. 2010).

4.1.2 Inhibitor p18

Zvýšení počtu buněk v populaci B-1a lymfocytů u pacientů trpících SLE lze z části připsat cyklin-dependentnímu kinázovému inhibitoru p18. U modelových organismů, které mají indukovaný SLE, se projevuje výrazně snížená exprese genu *Cdkn2c*, který kóduje právě inhibitor p18. Potula et al. zjistili, že snížená produkce p18 vede k produkci autoprotilátek, které rozeznávají buňky samotného organismu jako nežádoucí, tím se významně podílejí na specifických projevech SLE. Dalším překvapivým zjištěním byl fakt, že tato snížená produkce má za následek nejen zmnožení B-1a buněk v peritoneálních dutinách, nýbrž vede i k jejich posunu směrem k více autoreaktivním. U B-1a buněk s poškozeným lokusem dochází i v podmínkách *in vitro* po působení specifických stimulantů i po přenesení do zdravých jedinců, ke zvýšené produkci IgM a IgG, toto zjištění jasně ukázalo na funkci p18, respektive jeho nedostatku, jako klíčového faktoru, který ovlivňuje produkci protilátek a indukuje autoreaktivitu u B-1a buněk. Výrazně větší účinek u B-1a buněk, než u ostatních B buněk, zároveň ukazuje na fakt, že B-1a buňky mají pravděpodobně schopnost vyšší expanze než ostatní B buňky. Zároveň došlo ke zjištění, že *Cdkn2c* je jednou z hlavních možností, jak kontrolovat počet B-1a buněk v organismu. Během této studie se ukázalo, že nadměrná populace B-1a lymfocytů způsobená chybějícím p18 jde zmírnit zastavením dodávek cyklinu D2, jehož absence má za následek výrazný pokles v počtu B-1a buněk (Potula et al. 2012).

4.1.3 BAFF, CD19 a jejich spojitost se SLE

Během rozvoje SLE hraje roli i další výše zmíněný faktor - BAFF. Místem exprese BAFF jsou primárně dendritické buňky, místem jeho efektu jsou ovšem B buňky. Pod jeho vlivem dochází k maturaci a proliferaci, navíc buňky ovlivněné jeho zvýšenou hladinou vykazují nárůst v expresi MHC gp II a proapoptotického proteinu Bcl-2 (B-cell lymphoma-2), které jsou indikátorem jejich aktivace. Kromě toho dochází také ke zmnožení populace B-1 buněk. V případě buněk přítomných ve slezině hovoříme až o sedminásobném nárůstu v jejich počtu, oproti normálním stavům (Mackay et al. 1999). Fairfax et. al. ukázali, že ve zmnožené populaci B-1 buněk, dochází k akumulaci autoreaktivních klonů. To vede k produkci širokého spektra autoprotilátek, které mají za následek rozvoj autoimunitních projevů, jako je nefritida a právě SLE. Ke správné činnosti BAFF je nicméně vyžadována exprese CD19. V případě, že byla v modelovém organismu navozena

snížená exprese CD19, nebyla tvorba BAFF dostačující pro úspěšnou maturaci B buněk. Přesto hladina CD19 postačovala k tvorbě dostatečného množství BAFF, aby bylo možné udržovat populaci B buněk. Tento objev by mohl v budoucnu položit základy imunoterapie SLE, cílené na omezení exprese CD19 v nemocném organismu (Fairfax et al. 2015).

4.2 B buněčná chronická lymfatická leukémie

Mezi často se vyskytující autoimunitní onemocnění patří i B-CLL. Dle počtu zaznamenaných případů se jedná o nejčastější formu leukemie, vyskytující se u dospělých, v západních zemích. Pravděpodobnost jejího výskytu se zvyšuje spolu s věkem. Výzkumy z posledních let ukazují na spojitost mezi B-CLL a populací B-1a buněk. Jak již bylo řečeno dříve, populace B-1 lymfocytů se vyvíjí především během neonatálního období a později je udržována prostřednictvím sebeobnovování. Daný fakt nahrává možným mutacím, které mohou mít během stárnutí organismu za následek patologické změny v růstu buněk a jejich transformaci k chronické lymfatické leukémii. Podle studie Montecino-Rodriguez et. al. zahajují progenitory B-1 lymfocytů výrazně agresivnější typ leukemie, než je tomu u B-2 progenitorů. V současné době není uspokojivě vysvětlen rozdíl mechanismů vzniku leukemie, indukované rozdílnými progenitory (Montecino-Rodriguez et al. 2014).

4.2.1 Signalizace a reaktivita BCR

V rámci B-CLL se odlišují 2 podtypy, mutovaná a nemutovaná forma. V průběhu obou podtypů B-CLL dochází ke specifickým modifikacím imunoglobulinů exprimovaných B-1 lymfocyty. Jedná se především o změny ve frekvenci užití a v přestavbách V_H, D a J řetězců. Dané změny byly pozorovány u většího množství pacientů, zároveň změny projevující se na řetězcích byly ve velké míře shodné (Hervé et al. 2005). Fakt, že BCR různých pacientů s lymfatickou leukémií vykazují vysoký stupeň konzervovanosti vedl k předpokladu, že BCR hrají významnou roli v patogenních přeměnách. Zároveň ze známých skutečností vyplývá, že BCR jsou ovlivněny malým množstvím antigenů stejné podstaty (Ghiotto et al. 2004). Podle známých faktů se zdá nejpravděpodobnější, že stěžejními mediátory BCR signalizace u buněk B-CLL jsou Lyn a Syk. U obou těchto kináz dochází v rámci onemocnění k jejich zvýšené expresi. Dalším důležitým proteinem, který se účastní BCR

signalizace, je kináza LCK. Práce Talab et. al. ukázala, že LCK se podílí na signalizaci prostřednictvím ovlivňování fosforylace CD79a, dále na aktivaci Akt, NF- κ B a MAPK dráhy. Zvýšené hladiny těchto kináz (Lyn, Syk, LCK) mají za následek proliferaci stimulovaných leukemických klonů B-1 lymfocytů. Stejná práce ukazuje na klíčovou roli LCK během rozvoje onemocnění a poukazuje na případnou možnost terapeutického využití (Talab et al. 2013).

V případě nemutované formy B-CLL váží BCR rozmanitější množství antigenů a jsou tedy polyreaktivnější než receptory mutovaného typu. Pacienti s nemutovanou formou mají často horší vyhlídky, což naznačuje vliv polyreaktivity BCR na rozvoj B-CLL. Během výzkumu Chen et. al. se ukázalo, že BCR pacientů s nemutovanou rozvinutější formou B-CLL mají vyšší schopnost vázat fosfatidilcholin, který je součástí biologických membrán. Navazování bylo způsobeno rozpoznáním fosfatidilcholinu díky IgM, který se nalézal na vnější membráně. Výsledky ukazují na zvýšenou schopnost fosfatidilcholin-reaktivních buněk růst a jejich tendenci ke vzniku a rozvoji B-CLL (Chen et al. 2013). Shodně s rychlým postupem onemocnění se vyskytuje mnohem vyšší pravděpodobnost vzniku nádoru. Bohužel výsledky výzkumu zatím neodhalily, proč tomu tak je. Ze známých skutečností pouze vyplývá, že B-1 progenitory exprimující onkogen BCR-ABL, mají sníženou frekvenci apoptózy, která je pravděpodobně způsobena sníženou citlivostí na p19^{Arf} (tumor supresor) (Montecino-Rodriguez et al. 2014). V současné době probíhá výzkum nových léčebných preparátů, které by cílily na signalizaci BCR (Hoellenriegel et al. 2011).

4.2.2 SPA-1

K rozvoji B-CLL může docházet také vlivem zvýšené hladiny proteinu SPA-1 (signal-induced proliferation-associated protein 1). Podle zjištěných faktů dochází u SPA-1^{-/-} jedinců k ovlivnění Rap-1 signalizace, tím dojde k ovlivnění BCR a modifikaci repertoáru citlivosti na odlišné faktory a ke změně tolerance na vlastní antigeny. Během života modelových organismů došlo u části z nich (konkrétně u 9 z 62 jedinců) ke zvětšení sleziny, zvýšení počtu B-1a lymfocytů produkujících anti-dsDNA protilátky, zároveň došlo k rozvoji nefritidy, rozvoji hemolytické anemie a dalším projevům typickým pro B-CLL (Ishida et al. 2006).

4.2.3 Enhancer E μ a onkogen TCL1

Pro rozvoj B-CLL je důležitý také enhancer E μ , který ovlivňuje některé mechanismy, které v případě nesprávné regulace mohou vést ke vzniku patogenních B-1 buněk. Mezi rizikové faktory podléhající enhanceru E μ patří například BRD2 (bromodomain-containing protein 2), což je transkripční kináza nalézající se v jádře. Podle známých skutečností ovlivňuje BRD2 pozitivně transkripci cyklinu A, zvýšená hladina cyklinu A má potom za následek proliferaci B buněk. V organismu s vysokou hladinou BRD2 potom lze najít lymfomy vzniklé dle fenotypu buněk z B-1 lymfocytů (*Greenwald et al. 2004*).

Dalším z faktorů, které jsou podřízeny enhanceru E μ je onkogen TCL1 (T cell leukemia 1), tento onkogen byl původně identifikován v populaci T lymfocytů, později byl ovšem objeven i u B-1 buněk. V případě působení enhanceru E μ na populaci B-1 lymfocytů může dojít k expanzi B-1 lymfocytů právě vlivem TCL1 (*Bichi et al. 2002*). Během výzkumu Hayakawa et. al. na modelových organismech se zvýšenou hladinou enhanceru E μ a vysokou hladinou TCL1, vyvolanou tímto enhancerem, bylo zjištěno, že B-1a buňky mají zvýšenou náchylnost ke změnám oproti ostatním typům B lymfocytů. Indukce B-CLL v populaci B-1 lymfocytů modelového organismu, lze dosáhnout pomocí onkogenu TCL1. B-1a buňky mohou do nežádoucích stavů přecházet i za působení běžnějších stimulantů. Konkrétně se jedná o expresi specifických BCR autoreaktivně reagujících na myosin IIA. Ovšem ne všechny B-1a lymfocyty jsou takto náchylné. Pro úspěšnou transformaci je vyžadováno spojení specifických těžkých a lehkých řetězců (*Hayakawa et al. 2016*). V případě transformace B-1 lymfocytů na maligní, se mění jejich citlivost na signalizaci BCR. Za normálních podmínek lze regulovat početnost populace B-1 lymfocytů přidáním IL-10, který je negativním regulátorem BCR signalizace. Transformované buňky ale ztrácí citlivost vůči IL-10, který pak nemůže ovlivňovat jejich schopnost přežít. (*Alhakeem et al. 2015*). Výzkum v této oblasti je ale stále na počátku a podrobné informace zatím nejsou známy.

Nové poznatky otevírají alternativní možnosti léčby. Například v minulém roce studie Novo et. al. ukázala na možnost blokace Wnt/beta-catenin signální dráhy, což má za následek sníženou proliferaci B-1 lymfocytů. Dané výsledky jsou zatím potvrzeny pouze v *in vitro* podmínkách. Nicméně vypadají slibně a dávají pacientům s tímto onemocněním novou naději (*Novo et al. 2015*).

5 Závěr

Díky objevu B-1 lymfocytů u lidí došlo v souvislosti s jejich výzkumem k nové vlně zájmu. Ve světle nových objevů byly přehodnoceny a zpřesněny známé skutečnosti, nicméně nové práce pozvedly i řadu zatím nezodpovězených otázek. V současné době probíhá velké množství studií v oblasti regulace a aktivace B-1 lymfocytů a jejich vlivu na průběh autoimunitních chorob. Nové objevy učiněné v tomto směru přináší zajímavé výsledky, které by mohly vést k novým terapeutickým přístupům při léčbě onemocnění jako je SLE a B-CLL. Probíhající studie tak přináší pacientům s těmito závažnými chorobami novou naději. Z dosavadních studií je však jasné, že se jedná o komplexní problematiku, pro jejíž uspokojivé objasnění bude ještě třeba dalších výzkumů.

6 Zdroje

- *Alhakeem, S.S., Sindhava, V.J., McKenna, M.K., Gachuki B.W., Byrd, J.C., Muthusamy, N., Bondada, S., 2015. Role of B cell receptor signaling in IL-10 production by normal and malignant B-1 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1362(1), pp.239–249.
- Alvares-Saraiva, A.M., Novo M.C.T, De Oliveira, V.C., Maricato, J.T., Lopes, J.D., Popi, A.F., Mariano, M., 2015. B-1 cells produce insulin and abrogate experimental streptozotocin-induced diabetes. *European Journal of Immunology*, 45(5), pp.1452–1461.
- *Baumgarth, N., Tung, J.W. & Herzenberg, L.A., 2005. Inherent specificities in natural antibodies: A key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Seminars in Immunopathology*, 26(4), pp.347–362.
- Bichi, R., Shinton, S.A., Martin, E.S., Koval, A., Calin, G.A. Cesari, R., Russo, G. Hardy, R.R., Croce, C.M., 2002. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10), pp.6955–60.
- Bikah, G., Carey, J., Ciallella, J.R., Tarakhovsky, A., Bondada S., 1996. CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5294), pp.1906–9.
- Boumsell, L., Bernard, A., Lepage, V., Degos, L., Lemerle, J., Dausset, J., 1978. Some chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulins share determinants with T cells. *European journal of immunology*, 8(12), pp.900–4.
- *Crocker, P.R., Paulson, J.C. & Varki, A., 2007. Siglecs and their roles in the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 7(4), pp.255–266.
- Dasu, T., Sindhava, V., Clarke, S.H., Bondada, S., 2009. CD19 signaling is impaired in murine peritoneal and splenic B-1 B lymphocytes. *Molecular Immunology*, 46(13), pp.2655–2665.
- DeFranco, A.L., Chan, V.W.F. & Lowell, C.A., 1998. Positive and negative roles of the tyrosine kinase Lyn in B cell function. *Seminars in immunology*, 10(4), pp.299–307.
- Ding, C., Liu. Y., Wang, Y., Park, B.K., Wang, C., Zheng, P., Liu, Y., 2007. Siglecg limits the size of B1a B cell lineage by down-regulating NFκB activation M. You, ed. *PLoS ONE*, 2(10), p.e997.
- Enghard, P., Humrich, J.Y., Chu, V.T., Grussie, E., Hiepe, F., Burmester, G-R., Radbruch, A., Berek, C., Riemekasten, G., 2010. Class switching and consecutive loss of dsDNA-reactive B1a B cells from the peritoneal cavity during murine lupus development. *European Journal of Immunology*, 40(6), pp.1809–1818.
- Fairfax, K.A., Tsantikos, E., Figgett, W.A., Vincent, F.B., Quah, P.S., LePage, M., Hibbs, M.L., Mackay, F., 2015. BAFF-driven autoimmunity requires CD19 expression. *Journal of Autoimmunity*, 62, pp.1–10.

- Gary-Gouy, H., Harriague, J., Dalloul, A., Donnadieu, E., Bismuth, G., 2002. CD5-negative regulation of B cell receptor signaling pathways originates from tyrosine residue Y429 outside an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(1), pp.232–239.
- Ghiotto, F., Fais, F., Valetto, A., Albesiano, E., Hashimoto, S., Dono, M., Ikematsu, H., Allen, S.L., Kolitz, J., Rai, K.R., Nardini, M., Tramontano, A., Ferrarini, M., Chiorazzi, N., 2004. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*, 113(7), pp.1008–1016.
- Greenwald, R.J., Tumang, J.R., Sinha, A., Currier, N., Cardiff, R.D., Rothstein, T.L., Faller, D.V., Denis, G.V., 2004. Eμ-BRD2 transgenic mice develop B-cell lymphoma and leukemia. *Blood*, 103, pp.1475–1484.
- Griffin, D.O., Holodick, N.E. & Rothstein, T.L., 2011. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20⁺ CD27⁺ CD43⁺ CD70. *J Exp Med*, 208(1), pp.67–80.
- Griffin, D.O., Rothstein, T.L., 2011. A small CD11b(+) human B1 cell subpopulation stimulates T cells and is expanded in lupus. *The Journal of experimental medicine*, 208(13), pp.2591–8.
- Griffin, D.O., Rothstein, T.L., 2012. Human “orchestrator” CD11b(+) B1 cells spontaneously secrete interleukin-10 and regulate T-cell activity. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 18(1), pp.1003–8.
- Gururajan, M., Jacob, J. & Pulendran, B., 2007. Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell subsets D. Unutmaz, ed. *PLoS ONE*, 2(9), p.e863.
- Hardy, R.R. & Hayakawa, K., 1991. A developmental switch in B lymphopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24), pp.11550–4.
- Hastings, W.D., Gurdak, S.M., Tumang, J.R., Rothstein, T.L., 2006. CD5⁺/Mac-1⁻ peritoneal B cells: A novel B cell subset that exhibits characteristics of B-1 cells
- Hayakawa, K., Hardy, R.R., Parks, D.R., Herzenberg, L.A., 1983. The “Ly-1 B” cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *The Journal of experimental medicine*, 157(1), pp.202–18.
- Hayakawa, K., Formica, A., Colombo, M., Shinton, S.A., Brill-Dashoff, J., Morse, H.C., Li, Y-S., Hardy, R.R., 2016. Loss of a chromosomal region with synteny to human 13q14 occurs in mouse chronic lymphocytic leukemia that originates from early-generated B1 B cells. *Leukemia*, 30(February), pp.1510–1519.
- Hervé, M., Xu, K., Ng, Y-S., Wardemann, H., Albesiano, E., Messner, B.T., Chiorazzi, N., Meffre, E., 2005. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *Journal of Clinical Investigation*, 115(6).

- Hoellenriegel, J., Meadows, S.A., Sivina, M., Wierda, W.G., Kantarjian, H., Keating, M.J., Giese, N., O'Briene, S., Yu, A., Miller, L.L., Lannutti, J., Burger, J.A., 2011. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 118(13), pp.3603–3612.
- Hoffmann, A., Kerr, S., Jellusova, J., Zhang, J., Weisel, F., Wellmann, U., Winkler, T.H., Kneitz, B., Crocker, P.R., Nitschke, L., 2007. Siglec-G is a B1 cell-inhibitory receptor that controls expansion and calcium signaling of the B1 cell population. *Nat Immunol*, 8(7), pp.695–704.
- Chen, S.-S., Batliwalla, F., Holodick, N.E., Yan, X.-J., Yancopoulos, S., Croce, C.M., Rothstein, T.L., Chiorazzi, N., 2013. Autoantigen can promote progression to a more aggressive TCL1 leukemia by selecting variants with enhanced B-cell receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(16), pp.E1500–7.
- Ishida, D., Su, L., Tamura, A., Katayama, Y., Kawai, Y., Wang, S.-F., Tanikawi, M., Hamazaki, Y., Hattori, M., Minato, N., 2006. Rap1 signal controls B cell receptor repertoire and generation of self-reactive B1a cells. *Immunity*, 24, pp.417–427.
- Jellusova, J., Wellmann, U., Amann, K., Winkler, T.H., Nitschke, L., 2010. CD22 x Siglec-G double-deficient mice have massively increased B1 cell numbers and develop systemic autoimmunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(7), pp.3618–3627.
- Kubo, T., Uchida, Y., Watanabe, Y., Abe, M., Nakamura, A., Ono, M., Akira, S., Takai, T., 2009. Augmented TLR9-induced Btk activation in PIR-B-deficient B-1 cells provokes excessive autoantibody production and autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*, 206(9), pp.1971–82.
- Lanier, L.L., Warner, N.L., Ledbetter, J.A., Herzenberg, L.A., 1981. Expression of Lyt-1 antigen on certain murine B cell lymphomas. *The Journal of experimental medicine*, 153(4), pp.998–1003.
- Mackay, F., Woodcock, S.A., Lawton, P., Ambrose, Ch., Baetscher, M., Schneider, P., Tschopp, J., Browning, J.L., 1999. Mice transgenic for Baff develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(11), pp.1697–1710.
- Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H., Dorshkind, K., 2006. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nature immunology*, 7(3), pp.293–301.
- Montecino-Rodriguez, E., Li, K., Fice, M., Dorshkind, K., 2014. Murine B-1 B cell progenitors initiate B-acute lymphoblastic leukemia with features of high-risk disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(11), pp.5171–8.
- Nitschke, L., Carsetti, R., Ocker, B., Köhler, G., Lamers, M.C., 1997. CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Current biology : CB*, 7(2), pp.133–143.

- Novo, M.C.T., Osugui, L., Oliveira dos Reis, V., Longo-Maugéri, I.M., Mariano, M., Popi, A.F., 2015. Blockage of Wnt/ β -catenin signaling by quercetin reduces survival and proliferation of B-1 cells in vitro. *Immunobiology*, 220(1), pp.60–67.
- O’Keefe, T.L., Williams, G.T., Batista, F.D., Neuberger, M.S., 1999. Deficiency in CD22, a B cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies. *The Journal of experimental medicine*, 189(8), pp.1307–1313.
- Pao, L.I., Lam, K-P., Henderson, J.M., Kutok, J.L., Alimzhanov, M., Nitschke, L., Thomas, M.L., Neel, B.G., Rajewsky, K., 2007. B cell-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase Shp1 promotes B-1a cell development and causes systemic autoimmunity. *Immunity*, 27(1), pp.35–48.
- Potula, H.-H.H.S.K., Xu, Z., Zeumer, L., Sang, A., Crocker, B.P., Morel, L., 2012. Cyclin-dependent kinase inhibitor Cdkn2c deficiency promotes B1a cell expansion and autoimmunity in a mouse model of lupus. *J Immunol*, 189(6), pp.2931–2940.
- Rodig, S.J., Shahsafaei, A., Li, B., Dorfman, D.M., 2005. The CD45 isoform B220 identifies select subsets of human B cells and B-cell lymphoproliferative disorders. *Human Pathology*, 36(1), pp.51–57.
- Sen, G., Bikah, G., Venkataraman, Ch., Bondada, S., 1999. Negative regulation of antigen receptor-mediated signaling by constitutive association of CD5 with the SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells. *European Journal of Immunology*, 29(10), pp.3319–3328.
- *Schwartz-Albiez, R., Monteiro, R.C., Rodriguez, M., Binder, C.J., Shoenfeld, Y., 2009. Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*, 158(SUPPL. 1), pp.43–50.
- Sims, G.P., Ettinger, R., Shirota, Y., Yarboro, Ch.H., Illei, G.G., Lipsky, P.E., 2005. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*, 105(11), pp.4390–4398.
- Sindhava, V.J., Woodman, M.E., Stevenson, B., Bondada, S., 2010. Interleukin-10 mediated autoregulation of murine B-1 B-cells and its role in *Borrelia hermsii* infection O. Rotzschke, ed. *PLoS ONE*, 5(7), p.e11445.
- *Sindhava, V.J., Bondada, S., 2012. Multiple regulatory mechanisms control B-1 B cell activation. *Frontiers in Immunology*, 3(DEC), p.372.
- Suchanek, O., Sadler, R., Bateman, E.A., Patel, S.Y., Ferry, B.L., 2012. Immunophenotyping of putative human B1 B cells in healthy controls and common variable immunodeficiency (CVID) patients. *Clinical and Experimental Immunology*, 170(3), pp.333–341.
- Talab, F., Allen, J.C., Thompson, V., Lin, K., Slupsky, J.R., 2013. LCK is an important mediator of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells. *Molecular cancer research: MCR*, 11(5), pp.541–54.

- Theofilopoulos, A.N., Dixon, F.J., 1985. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Advances in immunology*, 37, pp.269–390.
- Tung, J.W., Mrazek, M.D., Yang, Y., Herzenberg, L.A., 2006. Phenotypically distinct B cell development pathways map to the three B cell lineages in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(16), pp.6293–6298.